

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cxyb.003282

穿心莲内酯对 TBHP 诱导的椎间盘髓核细胞凋亡的作用及机制研究

范明宇, 卞 峰, 周少怀, 王 欣, 汪 平, 李 静, 黄娅芬, 李嘉琼
(武汉市第三医院骨一科, 武汉 430060)

【摘要】目的:探讨穿心莲内酯(andrographolide, ANDRO)对叔丁基过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide, TBHP)诱导的椎间盘髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPC)凋亡的作用及其机制。**方法:**用TBHP诱导NPC建立细胞模型。将NPC分为5组:对照组、模型组(100 μmol/L TBHP)、ANDRO低剂量组(100 μmol/L TBHP+9 μmol/L ANDRO)、ANDRO中剂量组(100 μmol/L TBHP+18 μmol/L ANDRO)和ANDRO高剂量组(100 μmol/L TBHP+36 μmol/L ANDRO)。流式细胞术检测细胞凋亡和活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平,ELISA试剂盒检测氧化应激相关指标超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)和过氧化氢酶(catalase, CAT)水平,JC-1探针法检测线粒体膜电位,Western blot检测动力相关蛋白1(dynamin-related protein 1, Drp1)、p-Drp1和线粒体融合蛋白2(mitofusin 2, Mfn2)的表达水平。**结果:**与对照组相比,模型组NPC凋亡率、ROS水平和线粒体膜电位下降细胞比例明显升高(均P=0.000),SOD、GSH-PX和CAT水平明显降低(均P=0.000),p-Drp1/Drp1水平明显上调(P=0.000),Mfn2蛋白表达明显下调(P=0.000)。与模型组相比,经ANDRO高剂量干预后,NPC凋亡率[(41.37 ± 0.84)% vs. (26.36 ± 1.33)%]、ROS水平[(42.62 ± 0.71)% vs. (22.50 ± 0.37)%]和线粒体膜电位下降细胞比例[(43.85 ± 0.71)% vs. (24.96 ± 1.04)%]明显降低(均P=0.000),SOD[(288.16 ± 14.59) ng/mL vs. (658.87 ± 13.22) ng/mL]、GSH-PX[(6.66 ± 0.37) ng/mL vs. (15.66 ± 0.56) ng/mL]和CAT[(40.89 ± 1.04) pg/mL vs. (87.91 ± 1.56) pg/mL]水平明显升高(均P=0.000),p-Drp1/Drp1水平(0.96 ± 0.05 vs. 0.63 ± 0.01)明显下调(P=0.001、0.000),Mfn2蛋白表达(0.39 ± 0.01 vs. 0.64 ± 0.02)明显上调(均P=0.000)。**结论:**ANDRO具有抑制TBHP诱导的NPC细胞凋亡的作用,其机制可能与调节线粒体功能,缓解氧化应激有关。

【关键词】穿心莲内酯;髓核细胞;椎间盘退变;细胞凋亡;线粒体氧化应激

【中图分类号】R274

【文献标志码】A

【收稿日期】2022-12-01

Effect of andrographolide on TBHP-induced apoptosis of intervertebral disc nucleus pulposus cells and its mechanism

Fan Mingyu, Bian Feng, Zhou Shaohuai, Wang Xin, Wang Ping, Li Jing, Huang Yafen, Li Jiaqiong
(Department of Orthopedics, Wuhan Third Hospital)

【Abstract】**Objective:** To investigate the effect and mechanism of andrographolide (ANDRO) on intervertebral disc nucleus pulposus cell (NPC) apoptosis induced by tert-butyl hydroperoxide (TBHP). **Methods:** The cell model of NPCs induced by TBHP was established. NPCs were divided into five groups: control group, model group (100 μmol/L TBHP), low-dose ANDRO group (100 μmol/L TBHP+9 μmol/L ANDRO), middle-dose ANDRO group (100 μmol/L TBHP+18 μmol/L ANDRO), and high-dose ANDRO group (100 μmol/L TBHP+36 μmol/L ANDRO). Cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) levels were determined by flow cytometry. The levels of oxidative stress related indicators, such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), and catalase (CAT), were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay kit. Mitochondrial membrane potential was measured by a JC-1 probe. Western blot was used to determine the expression levels of dynamin-related protein 1 (Drp1), phosphorylated Drp1 (p-Drp1), and mitofusin 2 (Mfn2). **Results:** Compared with the control group, the model group had significantly increased apoptosis rate of NPCs, ROS level, and proportion of cells with decreased mitochondrial membrane potential (all P=0.000), significantly decreased SOD, GSH-PX, and CAT levels (all P=0.000), a significantly up-regulated p-Drp1/Drp1 level (P=0.000), and significantly down-regulated protein expression of Mfn2 (P=0.000). Compared with the model group, the high-dose ANDRO group had significantly decreased

作者介绍:范明宇,Email:21872407@qq.com,

研究方向:骨代谢、椎间盘退变的基础研究。

基金项目:武汉市卫健委医学科研资助项目(编号:WX20Q09)。

优先出版:https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1046.R.20230717.1547.036.html

(2023-07-18)

apoptosis rate of NPCs [(41.37 ± 0.84)% vs. (26.36 ± 1.33)%], ROS level [(42.62 ± 0.71)% vs. (22.50 ± 0.37)%], and proportion of cells with decreased mitochondrial membrane potential [(43.85 ± 0.71)% vs. (24.96 ± 1.04)%] (all P=0.000), significantly increased SOD [(288.16 ± 14.59) ng/mL vs. (658.87 ± 13.22) ng/mL], GSH-PX

$[(6.66 \pm 0.37) \text{ ng/mL} \text{ vs. } (15.66 \pm 0.56) \text{ ng/mL}]$, and CAT $[(40.89 \pm 1.04) \text{ pg/mL} \text{ vs. } (87.91 \pm 1.56) \text{ pg/mL}]$ levels (all $P=0.000$), a significantly down-regulated p-Drp1/Drp1 level $(0.96 \pm 0.05 \text{ vs. } 0.63 \pm 0.01)$ ($P=0.001, 0.000$), and significantly up-regulated protein expression of Mfn2 $(0.39 \pm 0.01 \text{ vs. } 0.64 \pm 0.02)$ (all $P=0.000$). **Conclusion:** ANDRO can inhibit TBHP-induced NPC apoptosis, and the mechanism may be related to the regulation of mitochondrial function and the relief of oxidative stress.

[Key words] andrographolide; nucleus pulposus cell; intervertebral disc degeneration; apoptosis; mitochondrial oxidative stress

健康的椎间盘是由内层髓核细胞 (nucleus pulposus cells, NPC) 和周围纤维环 (annulus fibrosus, AF) 以及软骨终板组成^[1-2]。椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration, IVDD) 是导致椎间盘恶化的病理过程, 能够引发椎间盘突出和腰痛等, 严重威胁患者的生活质量^[3]。IVDD 是一个复杂的过程, 其分子机制尚未完全阐明。研究表明, 缺氧、炎症及机械负荷等细胞外刺激可引起 NPC 涅氏, 进而启动 IVDD 的发生^[4]。因此, 寻找有效抑制 NPC 涅氏的药物是延缓 IVDD 进程的重要途径。此外, 研究发现通过改善线粒体功能障碍和氧化应激也是一种治疗 IVDD 的策略^[5]。

穿心莲内酯 (andrographolide, ANDRO) 是一种从穿心莲中分离得到的主要活性成分, 具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤等多种生物学作用。临床研究表明, ANDRO 可用于治疗多种疾病, 如骨关节炎、上呼吸道疾病和多发性硬化症等^[6]。研究表明, ANDRO 可通过抑制线粒体裂变来保护神经元免受鱼藤酮或 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 诱导的损伤, 可作为临床治疗帕金森的潜在药物^[7]。但 ANDRO 是否可通过影响线粒体功能和氧化应激抑制 NPC 涅氏尚不清楚。本研究旨在探讨 ANDRO 对叔丁基过氧化氢 (tert-butyl hydroperoxide, TBHP) 诱导的 NPC 涅氏的作用及其机制, 为 ANDRO 治疗 IVDD 的临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

大鼠椎间盘髓核细胞 NPC 来源于武汉大学典型培养物保藏中心。DMEM 购自 Hyclone 公司, TBHP 购自 Sigma 公司, ANDRO 购自阿拉丁公司, CCK-8 和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自 Solarbio 公司, Annexin V-FITC/PI 涅氏检测试剂盒购自 BD 公司, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒和线粒体膜电位检测试剂盒购自 Beyotime 公司, PVDF 转移膜和化学发光试剂购自 Millipore 公司, 动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1) 抗体、线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2, Mfn2) 抗体、超氧化物歧化酶 (superoxide

dismutase, SOD) ELISA 试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 和过氧化氢酶 (catalase, CAT) ELISA 试剂盒购自 Bioswamp 公司, p-Drp1 (S637) 抗体购自 CST 公司。

1.2 细胞培养与模型构建

NPC 用含 10% 胎牛血清的 DMEM, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。显微镜下观察大鼠髓核细胞, 细胞呈梭形或多角形细胞, 贴壁生长 (图 1)。收集细胞, 调整细胞悬液浓度, 接种至 6 孔板, 5×10^5 个/孔, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。加入含 100 μmol/L TBHP 培养细胞 24 h 构建模型^[8]。

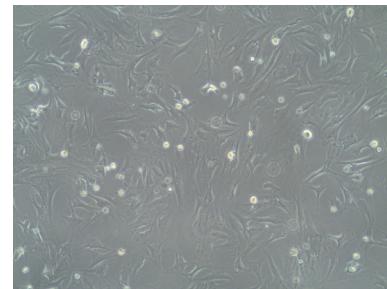


图 1 细胞观察

1.3 CCK-8 检测细胞活力

收集细胞, 将细胞接种于 96 孔板, 3×10^3 个/孔, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜, 使细胞贴壁, 待细胞贴壁 80% 左右, 用不同浓度 (0, 3, 6, 9, 18, 36, 72 μmol/L) ANDRO 处理 NPC 24 h 后^[9], 每孔加 10 μL CCK-8 溶液, 继续培养 4 h。使用酶标仪在 450 nm 处测量各孔的吸光度, 计算细胞活力。

1.4 实验分组

将 NPC 分为对照组、模型组以及 ANDRO 低、中、高剂量组。对照组不作任何处理。模型组 NPC 用 100 μmol/L TBHP 作用细胞 24 h。ANDRO 低、中、高剂量组 NPC 分别用 100 μmol/L TBHP+9 μmol/L ANDRO、100 μmol/L TBHP+18 μmol/L ANDRO、100 μmol/L TBHP+36 μmol/L ANDRO 作用细胞 24 h。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率

收集各组细胞, 取约 1×10^6 个细胞重悬, 离心后弃上清, 加预冷 PBS, 轻轻吹打混匀细胞, 离心后弃上清。用 PBS 重悬细胞, 加 10 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI, 轻轻混匀, 4 °C 避光孵育 30 min。加 300 μL PBS, 随即进行流式检测。

1.6 流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平

按照 1:1 000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10 μmol/L。收集各组细胞, 将其重悬于稀释好的 DCFH-

DA 中, 调整细胞密度为 1×10^6 个/mL, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱内孵育 20 min, 每隔 3 min 颠倒混匀 1 次, 使探针和细胞充分接触。孵育结束后, 用无血清培养基洗涤细胞 3 次, 去除多余的 DCFH-DA。加 500 μL PBS 重悬细胞, 流式细胞仪上机检测。

1.7 流式细胞仪检测线粒体膜电位

取 1×10^6 个细胞重悬, 加 0.5 mL JC-1 染色工作液, 轻轻吹打混匀, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱内孵育 20 min。孵育结束后离心弃上清, 用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次后, 加 400 μL JC-1 染色缓冲液重悬细胞, 流式细胞仪上机检测。

1.8 Western blot 检测线粒体融合与分裂相关蛋白表达水平

取各组细胞沉淀, 加入 RIPA 裂解液, 提取细胞总蛋白, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对蛋白进行定量。经 SDS-PAGE 电泳分离目的蛋白, 并将蛋白湿转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉 4°C 封闭过夜, 加一抗 (Drp1、p-Drp1、Mfn2 和 GAPDH, 稀释比 1:1000), 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 加 HRP 标记的二抗 (稀释比 1:20000), 室温孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次, 于暗室中加入 ECL 化学发光试剂, 置于全自动化学发光分析仪中检测, TANON GIS 软件读取条带灰度值。

1.9 ELISA 检测氧化应激因子 SOD、GSH-PX 和 CAT 水平

按照 SOD、GSH-PX 和 CAT ELISA 试剂盒说明书进行实验操作。

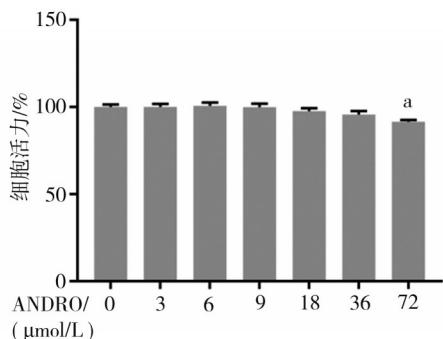
1.10 统计学处理

用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。GraphPad Prism 8.0 软件进行作图。实验数据中符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 ANDRO 对 NPC 的细胞毒性

CCK-8 检测结果见图 2 和表 1, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, 3 $\mu\text{mol/L}$ 、6 $\mu\text{mol/L}$ 、9 $\mu\text{mol/L}$ 、18 $\mu\text{mol/L}$ 和 36 $\mu\text{mol/L}$ ANDRO 对 NPC 增殖无明显影响 ($P=0.978$ 、 0.602 、 0.934 、 0.125 、 0.084), 而 72 $\mu\text{mol/L}$ 的 ANDRO 对 NPC 增殖具有抑制作用 ($P=0.001$), 差异具有统计学意义 ($F=11.329$, $P=0.000$)。因此后续实验选用 9 $\mu\text{mol/L}$ 、18 $\mu\text{mol/L}$ 和 36 $\mu\text{mol/L}$ ANDRO 处理 NPC。



注: a, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, $P<0.001$

图 2 ANDRO 对 NPC 增殖的影响

表 1 ANDRO 对 NPC 增殖的影响 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

ANDRO 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	细胞增殖 (%)
0	100.00 \pm 1.50
3	100.04 \pm 1.78
6	100.75 \pm 1.84
9	99.88 \pm 2.04
18	97.72 \pm 1.60
36	95.63 \pm 2.04
72	91.54 \pm 0.97 ^a
<i>F</i> 值	11.329
<i>P</i> 值	0.000

注: a, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, $P<0.001$

2.2 ANDRO 对 NPC 调亡的影响

流式细胞术检测结果见图 3。对照组、模型组以及 ANDRO 低、中、高剂量组细胞凋亡率分别为 $(6.22 \pm 1.18)\%$ 、 $(41.37 \pm 0.84)\%$ 、 $(34.75 \pm 1.29)\%$ 、 $(32.40 \pm 0.31)\%$ 、 $(26.36 \pm 1.33)\%$, 单因素方差分析显示 5 组细胞凋亡率差异有统计学意义 ($F=480.439$, $P=0.000$)。两两比较显示, 与对照组相比, 模型组 NPC 凋亡率明显升高 ($P=0.000$)。经 ANDRO 低、中、高剂量干预后, NPC 凋亡率明显降低 (均 $P=0.000$)。表明 ANDRO 可抑制 TBHP 诱导的 NPC 凋亡。

2.3 ANDRO 对 NPC 中 ROS 水平的影响

流式细胞术检测结果见图 4。对照组、模型组以及 ANDRO 低、中、高剂量组细胞中 ROS 水平分别为 $(9.05 \pm 1.15)\%$ 、 $(42.62 \pm 0.71)\%$ 、 $(35.32 \pm 1.10)\%$ 、 $(28.65 \pm 0.86)\%$ 、 $(22.50 \pm 0.37)\%$, 单因素方差分析显示 5 组细胞凋亡率差异有统计学意义 ($F=629.303$, $P=0.000$)。两两比较显示, 与对照组相比, 模型组 NPC 中 ROS 水平明显升高 ($P=0.000$)。经 ANDRO 低、中、高剂量干预后, NPC 中 ROS 水平明显降低 (均 $P=0.000$), 表明 ANDRO 可抑制 NPC 中 TBHP 诱导的 ROS 增多。

2.4 ANDRO 对 NPC 中氧化应激相关指标的影响

ELISA 检测结果见图 5 和表 2。与对照组相比, 模型组 NPC 中 SOD、GSH-PX 和 CAT 水平明显降低 (均 $P=0.000$)。经 ANDRO 低、中、高剂量干预后, NPC 中 SOD、GSH-PX 和 CAT 水平明显升高 (均 $P=0.000$), 采用单因素方差分析进行统计学分析, 差异均具有统计学意义 ($F_{\text{SOD}}=1337.821$, $P_{\text{SOD}}=0.000$; $F_{\text{GSH-PX}}=411.333$, $P_{\text{GSH-PX}}=0.000$; $F_{\text{CAT}}=926.843$, $P_{\text{CAT}}=0.000$), 表明 ANDRO 可缓解 TBHP 诱导的 NPC 氧化应激。

2.5 ANDRO 对 NPC 线粒体膜电位的影响

流式细胞术检测结果见图 6。对照组、模型组以及 ANDRO 低、中、高剂量组细胞线粒体膜电位分别为 $(4.59 \pm 0.47)\%$ 、 $(43.85 \pm 0.71)\%$ 、 $(35.03 \pm 0.47)\%$ 、 $(30.97 \pm 1.02)\%$ 、 $(24.96 \pm 1.04)\%$, 单因素方差分析显示 5 组细胞凋亡率差异有统计学意义 ($F=1052.458$, $P=0.000$)。两两比较显示, 与对照组相比, 模型组 NPC 线粒体膜电位下降细胞比例明显升高 ($P=0.000$)。经 ANDRO 低、中、高剂量干预后, NPC 线粒体膜电位下降细胞比例明显降低 (均 $P=0.000$), 表明 ANDRO

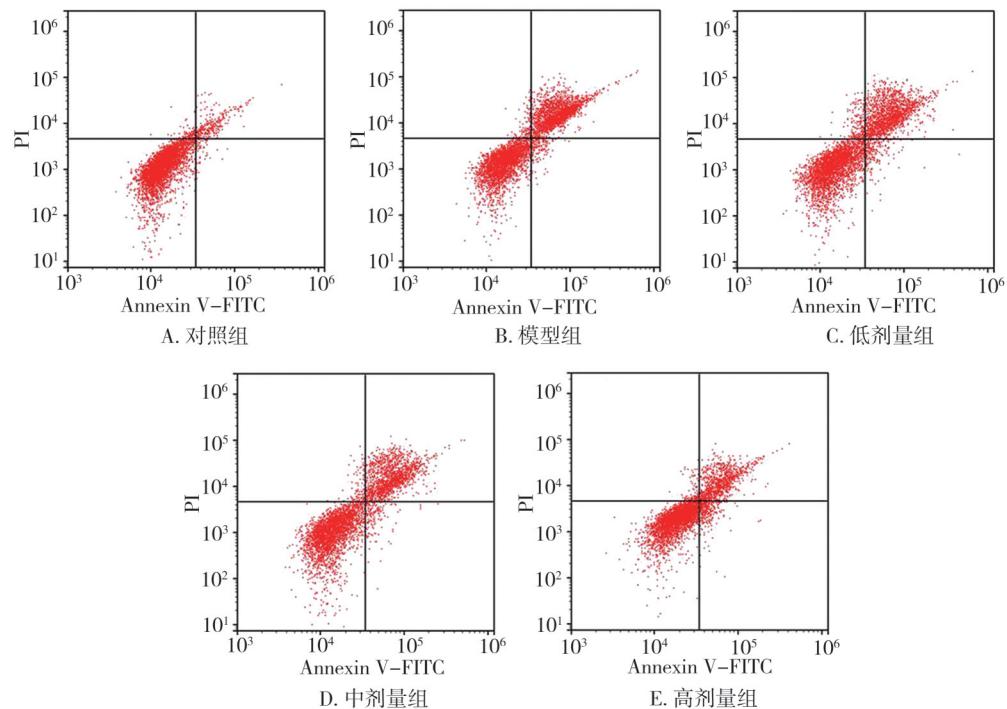


图3 ANDRO对NPC凋亡的影响

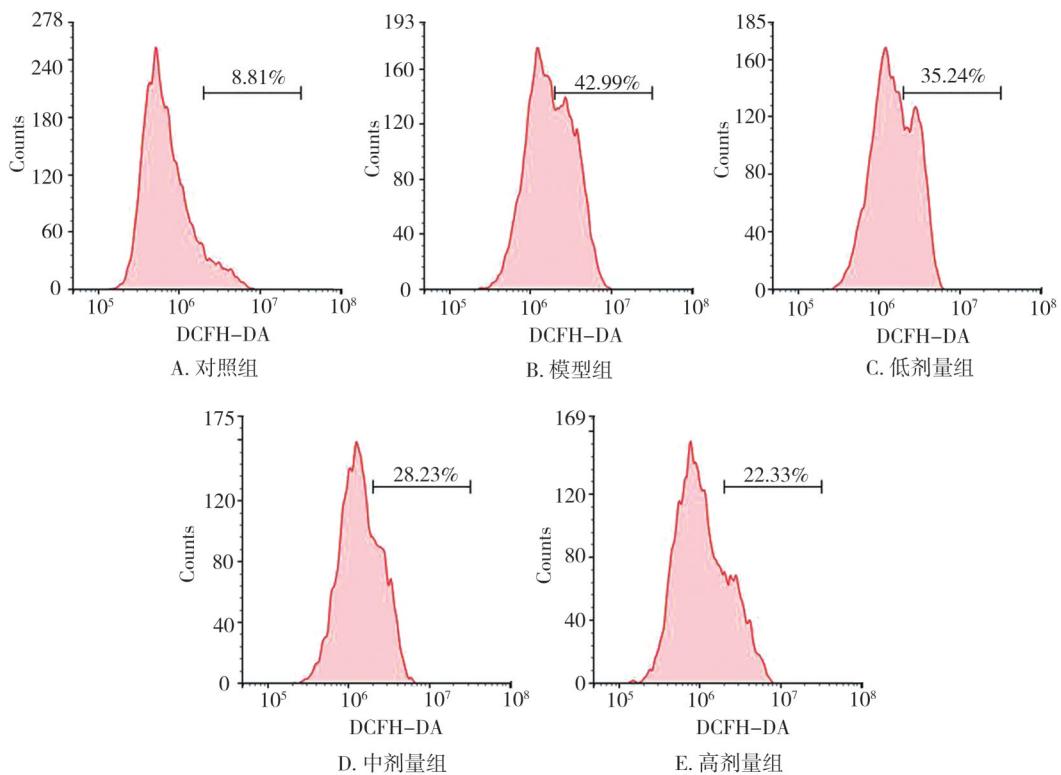


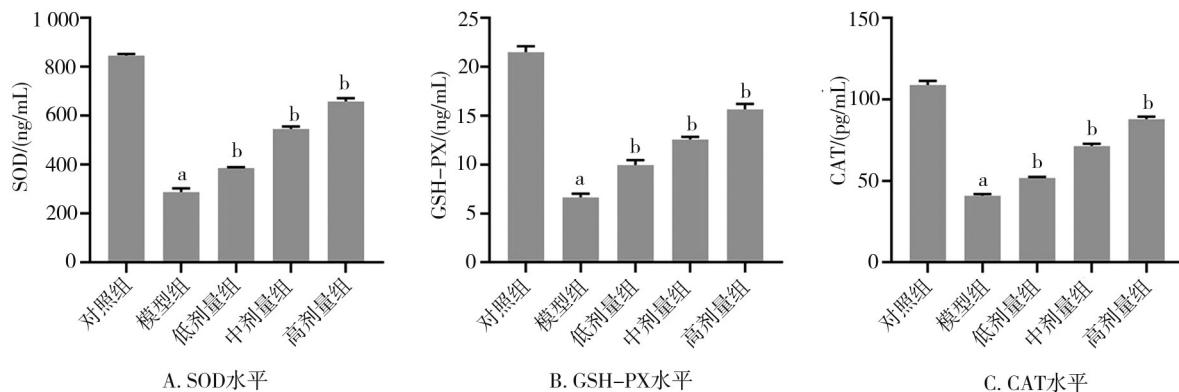
图4 ANDRO对NPC中ROS水平的影响

可抑制TBHP诱导的NPC线粒体膜电位下降。

2.6 ANDRO 对 NPC 线粒体裂变和融合相关蛋白表达的影响

Western blot 检测结果见图 7 和表 3。与对照组相比,模

型组 NPC 中 p-Drp1/Drp1 水平明显升高 ($P=0.000$), Mfn2 蛋白表达明显降低 ($P=0.000$)。与模型组相比, ANDRO 低剂量组 NPC 中 p-Drp1/Drp1 水平无明显变化 ($P=0.097$), Mfn2 蛋白表达明显升高 ($P=0.032$), ANDRO 中、高剂量组 NPC 中



注: a, 与对照组比较, $P < 0.001$; b: 与模型组比较, $P < 0.001$

图 5 ANDRO 对 NPC 中氧化应激相关指标的影响

表 2 ANDRO 对 NPC 中氧化应激相关指标的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD/(ng/mL)	GSH-PX/(ng/mL)	CAT /(pg/mL)
对照组	846.25 ± 6.62	21.50 ± 0.61	108.93 ± 2.47
模型组	288.16 ± 14.59 ^a	6.66 ± 0.37 ^a	40.89 ± 1.04 ^a
ANDRO 低剂量组	386.58 ± 2.92 ^b	9.97 ± 0.51 ^b	51.87 ± 0.61 ^b
ANDRO 中剂量组	546.19 ± 10.30 ^b	12.57 ± 0.28 ^b	71.42 ± 1.45 ^b
ANDRO 高剂量组	658.87 ± 13.22 ^b	15.66 ± 0.56 ^b	87.91 ± 1.56 ^b
F 值	1 337.821	411.333	926.843
P 值	0.000	0.000	0.000

注: a, 与对照组比较, $P < 0.001$; b: 与模型组比较, $P < 0.001$

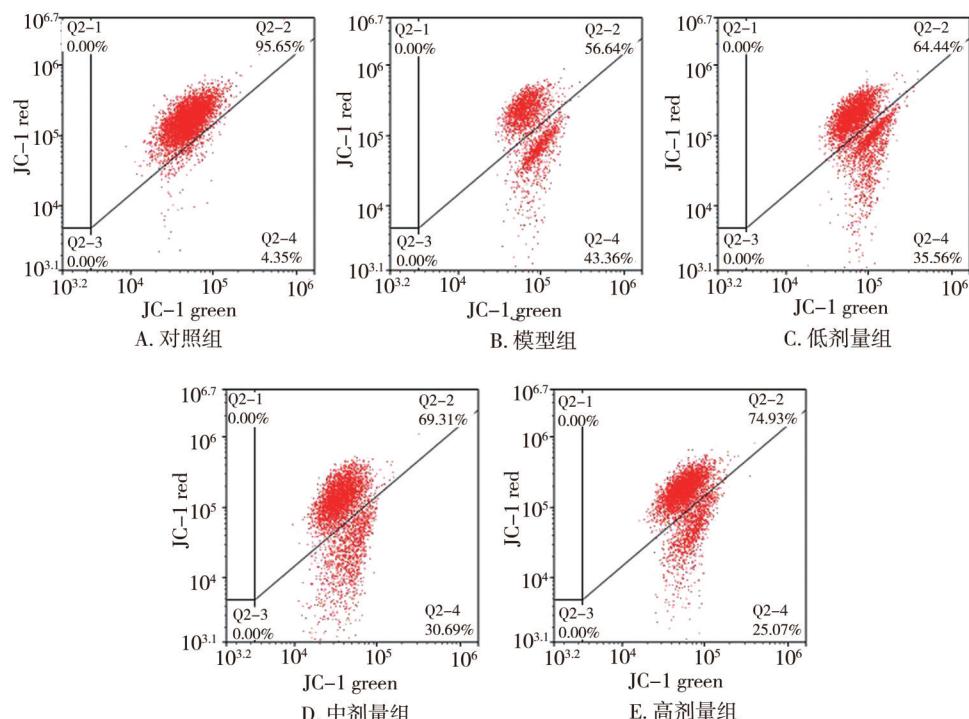
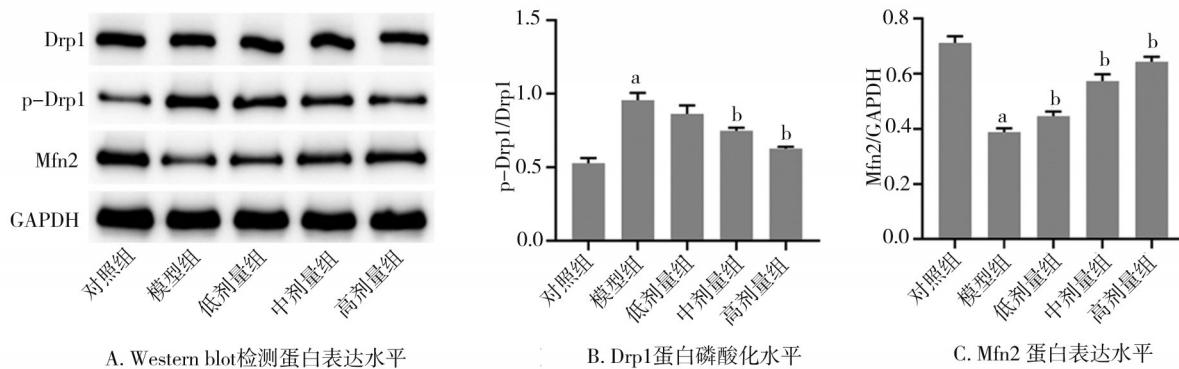


图 6 ANDRO 对 NPC 线粒体膜电位的影响

p-Drp1/Drp1 水平明显降低 ($P=0.001$ 、 0.000), Mfn2 蛋白表达明显升高 (均 $P=0.000$), 采用单因素方差分析进行统计学分

析, 差异具有统计学意义 ($F_{p-Drp1/Drp1}=57.592, P_{p-Drp1/Drp1}=0.000$; $F_{Mfn2}=137.788, P_{Mfn2}=0.000$)。



注: a, 与对照组比较, $P < 0.001$; b, 与模型组比较, $P < 0.05$

图 7 ANDRO 对 NPC 线粒体裂变和融合相关蛋白表达的影响

表 3 ANDRO 对 NPC 线粒体裂变和融合相关蛋白表达的影响
($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	p-Drp1/Drp1	Mfn2
对照组	0.53 ± 0.04	0.71 ± 0.02
模型组	0.96 ± 0.05^a	0.39 ± 0.01^a
ANDRO 低剂量组	0.86 ± 0.06	0.45 ± 0.02^b
ANDRO 中剂量组	0.75 ± 0.02^b	0.57 ± 0.02^b
ANDRO 高剂量组	0.63 ± 0.01^b	0.64 ± 0.02^b
F 值	57.592	137.788
P 值	0.000	0.000

注: a, 与对照组比较, $P < 0.001$; b, 与模型组比较, $P < 0.05$

3 讨 论

研究发现 TBHP 会导致 NPC 线粒体功能障碍, 促进 NPC 液亡, 并诱导炎症反应, 可用于构建 NPC 退变模型^[10]。本研究利用 TBHP 处理 NPC, 构建 NPC 液亡模型, 结果显示 TBHP 可导致 NPC 液亡、氧化应激和线粒体功能障碍, 与前人研究结果一致, 提示模型构建成功。药理研究表明, ANDRO 具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒和神经保护等作用^[6]。在帕金森和非小细胞肺癌等疾病中已有相关研究报道 ANDRO 可影响线粒体自噬和液亡途径^[11]。本研究发现, ANDRO 可抑制 TBHP 诱导的 NPC 液亡及 ROS 过度产生, 缓解氧化应激和线粒体功能障碍。

研究表明, IVDD 的病理生理机制与髓核 (nucleus pulposus, NP) 和 AF 退化、DNA 损伤、细胞衰老、氧化应激、细胞外基质、基质金属蛋白酶和 ROS 等密切相关^[12]。NPC 液亡是 IVDD 进展的关键因素, 氧化应激诱导的线粒体功能障碍是触发 NPC 液亡内在途径的重要机制之一^[13-14]。研究表明, ROS 可激活核因子 κB (nuclear factor kappa-B, NF-

κB) 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路, 增加炎症细胞因子的产生, 促进椎间盘细胞凋亡和衰老^[15]。线粒体功能障碍是 ROS 产生的主要原因, 同时线粒体也是 ROS 的主要靶点, 高水平的 ROS 可导致线粒体功能障碍, 其特点是线粒体质量丧失、呼吸链缺陷、线粒体通透性转换孔打开及线粒体膜电位降低, 引发 NPC 过度分解代谢, 增加椎间盘微环境炎症^[16]。Li B 等^[17]发现 ANDRO 可通过上调软骨细胞中 SOD、CAT 的水平, 从而降低氧化应激损伤, 有潜力作为治疗骨关节炎的药物。本研究结果显示, TBHP 诱导的 NPC 液亡率和 ROS 水平明显升高, SOD、GSH-PX 和 CAT 水平明显降低, 线粒体膜电位下降细胞比例明显升高; 而经 ANDRO 干预后, NPC 液亡率和 ROS 水平明显降低, SOD、GSH-PX 和 CAT 水平明显升高, 线粒体膜电位下降细胞比例明显降低。这表明, ANDRO 可抑制 TBHP 诱导的 NPC 液亡, 缓解氧化应激和线粒体功能障碍。

在正常生理条件下, 线粒体会发生持续的裂变和融合以满足细胞能量需求, 过度的线粒体裂变会导致线粒体破碎, 发生功能障碍, 最终导致细胞死亡^[18]。Qin X 等^[19]研究结果显示, 通过抑制 ROS 过度产生, 抑制 Drp1 介导的线粒体裂变保护足细胞免受棕榈酸诱导的损伤和液亡。Hu L 等^[20]研究表明, 通过调节 Mfn2 促进线粒体融合并恢复线粒体膜电位, 抑制了线粒体氧化应激并改善了高糖和高脂处理的心肌细胞线粒体功能, 指出通过调节 Mfn2 靶向线粒体动力学有利于治疗糖尿病心肌病。Geng J 等^[7]发现 ANDRO 可与 Drp1 结合, 抑制 GTP 酶的活性, 从而防止线粒体过度分裂, 进而缓解细胞损伤。本研

究发现 ANDRO 可下调 NPC 中 TBHP 引起的 Drp1 蛋白表达升高,上调 TBHP 引起的 Mfn2 蛋白表达降低,表明 ANDRO 可通过抑制线粒体裂变和促进线粒体融合来缓解细胞损伤。

综上所述,本研究结果显示 ANDRO 具有抑制 TBHP 诱导的 NPC 凋亡的作用,其机制可能与抑制线粒体裂变、促进线粒体融合、缓解氧化应激有关。本研究仅在大鼠 NPC 中进行了研究,后续将通过人类来源的退变 NPC 和体内实验进一步明确 ANDRO 治疗 IVDD 的作用机制,为 ANDRO 在 IVDD 的临床治疗提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Wang D, He X, Wang D, et al. Quercetin suppresses apoptosis and attenuates intervertebral disc degeneration via the SIRT1-autophagy pathway[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 613006.
- [2] Zhang JW, Zhang JY, Zhang YL, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes ameliorate intervertebral disc degeneration through inhibiting pyroptosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(20): 11742–11754.
- [3] Zhao YP, Qiu C, Wang WH, et al. Cortistatin protects against intervertebral disc degeneration through targeting mitochondrial ROS-dependent NLRP3 inflammasome activation[J]. *Theranostics*, 2020, 10(15): 7015–7033.
- [4] 朱超, 阮狄克. 椎间盘退变机制研究进展[J]. 中国骨与关节杂志, 2022, 11(9): 700–706.
- Zhu C, Ruan DK. Research advances on intervertebral disc degeneration mechanism[J]. *Chin J Bone Jt*, 2022, 11(9): 700–706.
- [5] Kang L, Liu SW, Li JC, et al. The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ protects against intervertebral disc degeneration by ameliorating mitochondrial dysfunction and redox imbalance[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(3): e12779.
- [6] Burgos RA, Alarcón P, Quiroga J, et al. Andrographolide, an anti-inflammatory multitarget drug: all roads lead to cellular metabolism[J]. *Molecules*, 2020, 26(1): 5.
- [7] Geng J, Liu W, Gao J, et al. Andrographolide alleviates Parkinsonism in MPTP-PD mice via targeting mitochondrial fission mediated by dynamin-related protein 1[J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(23): 4574–4591.
- [8] Chen DH, Xia DD, Pan ZY, et al. Metformin protects against apoptosis and senescence in nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration *in vivo*[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(10): e2441.
- [9] Liu JW, Jiang TM, He MW, et al. Andrographolide prevents human nucleus pulposus cells against degeneration by inhibiting the NF-κB pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 9631–9639.
- [10] Chen Y, Wu YQ, Shi HX, et al. Melatonin ameliorates intervertebral disc degeneration via the potential mechanisms of mitophagy induction and apoptosis inhibition[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(3): 2136–2148.
- [11] Chen Z, Tang WJ, Zhou YH, et al. Andrographolide inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation through the activation of the mitochondrial apoptosis pathway and by reprogramming host glucose metabolism[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(22): 1701.
- [12] Rider SM, Mizuno S, Kang JD. Molecular mechanisms of intervertebral disc degeneration[J]. *Spine Surg Relat Res*, 2019, 3(1): 1–11.
- [13] Song Y, Li S, Geng W, et al. Sirtuin 3-dependent mitochondrial redox homeostasis protects against AGEs-induced intervertebral disc degeneration[J]. *Redox Biol*, 2018, 19: 339–353.
- [14] Lin JL, Zhuge JR, Zheng XQ, et al. Urolithin A-induced mitophagy suppresses apoptosis and attenuates intervertebral disc degeneration via the AMPK signaling pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 150: 109–119.
- [15] Yu HC, Hou GW, Cao JK, et al. Mangiferin alleviates mitochondrial ROS in nucleus pulposus cells and protects against intervertebral disc degeneration via suppression of NF-κB signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6632786.
- [16] Feng CC, Yang MH, Lan MH, et al. ROS: crucial intermediators in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 5601593.
- [17] Li B, Jiang TM, Liu H, et al. Andrographolide protects chondrocytes from oxidative stress injury by activation of the Keap1-Nrf2-Are signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234(1): 561–571.
- [18] Kim B, Park J, Chang KT, et al. Peroxiredoxin 5 prevents amyloid-beta oligomer-induced neuronal cell death by inhibiting ERK-Drp1-mediated mitochondrial fragmentation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 90: 184–194.
- [19] Qin X, Zhao Y, Gong J, et al. Berberine protects glomerular podocytes via inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission and dysfunction[J]. *Theranostics*, 2019, 9(6): 1698–1713.
- [20] Hu L, Ding MG, Tang DS, et al. Targeting mitochondrial dynamics by regulating Mfn2 for therapeutic intervention in diabetic cardiomyopathy[J]. *Theranostics*, 2019, 9(13): 3687–3706.

(责任编辑:冉明会)